

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

INTRAKUTANTESTE MIT TOXINFILTRATEN VON CL. WELCHII
AN IMMUNISIERTEN MEERSCHWEINCHEN UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER TYPENDIFFERENZIERUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Falko Franke
Tierarzt aus Klietz

Berlin 1968
Journal-Nr. 607

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

INTRAKUTANTESTE MIT TOXINFILTRATEN VON CL. WELCHII
AN IMMUNISIERTEN MEERSCHWEINCHEN UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER TYPENDIFFERENZIERUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Falko Franke
Tierarzt aus Klietz

Berlin 1968
Journal-Nr. 607

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. G. Bergmann
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwig
Korreferent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell

Tag der Promotion: 13.2.1968



I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
<u>Einleitung</u>	5
<u>Literatur über Toxinarten von Cl. welchii und deren Nachweis</u>	7
<u>Eigene Untersuchungen</u>	16
A. Material und Methoden	
1. Stämme und Kultivierung	17
2. Herstellung toxinhaltiger Filtrate	18
3. Vakzineherstellung zur Immunisierung und Sensibilisierung der Meerschweinchen	20
4. Ermittlung der kleinsten letal wirkenden Dosis (Dlm) und der kleinsten nekrotisierenden Dosis (Dnm) im Letalitäts- und Hautnekrosetest	21
5. Technik der Neutralisation im Letalitätstest	22
B. Ergebnisse	
1. Vergleich zweier optimaler flüssiger Nährmedien hinsichtlich der Toxinproduktion	24
2. Toxingehaltsbestimmungen nach 6- und 16-stündiger Bebrütung bei pH 6,0 und 7,0 unter Verwendung des LOGAN-Nährmediums	25
3. Einfluß der Aufbewahrung der Filtratchargen bei -19° C und +37° C auf die Toxinwirksamkeit	27
4. Vergleich der Dlm und Dnm der Toxinfiltrate bei einzelnen Typstämmen	29
5. Antikörperbildung in wöchentlichen Intervallen bei immunisierten Meerschweinchen	30
6. Nekrotisierende Endtiter bei immunisierten und nicht immunisierten Meerschweinchen	32

<u>Besprechung</u>	38
<u>Zusammenfassung</u>	45
<u>Literaturverzeichnis</u>	47

Einleitung

Die Typendifferenzierung bei Cl. welchii erfolgt durch den Nachweis des Vorhandenseins oder des Fehlens von 10 der 12 bekannten Toxine. Von diesen 10 Toxinen zeichnen sich 4 durch eine besonders große Letalität aus. Diese 4 von BROOKS, STERNE und WARRACK (6) als Hauptletaltoxine bezeichneten Antigene sind bei den einzelnen Typstämmen so verteilt, daß durch Neutralisationsteste im Mäuseversuch eine Typisierung zunächst in 4 Gruppen möglich war.

Durch Degeneration kann es vorkommen, daß eines dieser Hauptletaltoxine nicht ausgebildet wird. Diese Tatsache veranlaßte OAKLEY (43) 1953, auch die letalen Nebentoxine und die nichtletalen Toxine in die Typendiagnostik einzubeziehen und die Untersuchung auf 10 bestimmte Toxine auszudehnen.

BROOKS, STERNE und WARRACK (6) prüften 1957 etwa 300 Stämme nach der von OAKLEY (43) angegebenen Methodik und stellten bei den letalen Nebentoxinen und den nichtletalen Toxinen einiger Typen gleichartige Abweichungen fest. Diese Stämme faßten sie in Untergruppen und nicht in selbständigen Typen mit der Begründung zusammen, daß die Typendifferenzierung bei Cl. welchii sich strikt nach den Hauptletaltoxinen richten müsse und die übrigen Toxine für die Differenzierung nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Cl. welchii wird bei Tieren nicht selten isoliert und ist in letzter Zeit wiederholt bei Fällen von Mastitis und Enteritis festgestellt worden. Oft fehlen jedoch Angaben, welcher Typ vorgelegen hat, weil die Differenzierung der Typen mit einfachen Methoden nicht gelingt.

Da die 4 Hauptletalttoxine auch dermonekrotische Wirkung besitzen, war es das Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob mit dem Intrakutantest an immunisierten Meerschweinchen eine Typisierung möglich ist. Es sollten an mit bekannten Stammfiltraten immunisierten Meerschweinchen mit Kulturfiltraten bekannter Stämme des Cl. welchii Hautnekroseteste durchgeführt und festgestellt werden, ob die Nekrosen bei homologen Filtraten durch Neutralisation vermindert oder sogar ausbleiben würden und ob sich Unterschiede bei Hautnekrosetesten an immunisierten und nicht immunisierten Meerschweinchen ergeben würden.

Literatur über Toxinarten von Cl. welchii und deren Nachweis

DALLING, ALLEN und MASON (10) zeigten 1925, daß der von GAIGER und DALLING bei Lämmerdysenteriefällen in Nord-England isolierte Stamm ein Letaltoxin produzierte, das sich immunologisch von dem des Gasbranderregers unterschied. Das Toxin dieses Lämmerdysenterie-Bazillus besaß in frischem Zustand eine große letale Wirkung. Es verlor jedoch selbst bei Kühlschranktemperaturen schnell seine Toxizität.

MC EWEN (17) isolierte 1930 aus "Struck"- und Gangränfällen bei Mutterschafen einen weiteren Stamm, der ein Toxin mit starker Letal- und Nekrosewirkung bildete und dessen Antiserum keine Filtrate des Lämmerdysenterie-Bazillus im Mäuseletalitätstest zu neutralisieren vermochten. Er nannte ihn Bac. paludis.

MC EWEN und ROBERTS (18) zeigten 1931, daß durch Resorption großer Toxinmengen dieses Stammes die Erkrankungen des "Struck" und Gangräs hervorgerufen werden.

BENNETS (3) züchtete 1932 aus dem Darm von an Enterotoxaemie erkrankten Schafen einen Keim, dessen größte Letalwirkung man nach 24- bis 48stündiger Bebrütung erhielt. Er nannte ihn Bac. ovitoxicus. Das Filtrat des Stammes wurde durch homologes Serum und durch das Serum des Lämmerdysenterie-Bazillus, jedoch nicht durch das Serum des Bac. paludis neutralisiert.

WILSDON (54) bewies 1931 durch Mäuseletalitätsteste, daß für die immunologischen Eigenschaften der Filtrate mindestens 3 toxische Faktoren verantwortlich sind.

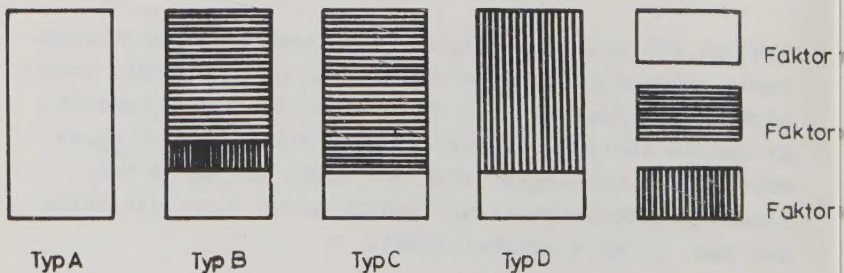
Er bezeichnete

- den Gasbranderreger als Typ A,
- den Lämmerdysenterie-Bazillus als Typ B,
- den Bac. paludis als Typ C und
- den Bac. ovitoxicus als Typ D.

A-Filtrate wurden durch die Seren aller 4 Typen neutralisiert. Das führte zu der Auffassung, daß der Letalfaktor W als Antigen von Typ A in den Filtraten aller 4 Typen enthalten sein mußte.

B-Filtrate wurden nur durch Typ-homologe Seren neutralisiert, aber B-Antiseren neutralisierten außerdem A- und C-Filtrate. Da B- und C-Filtrate von A-Antiseren nicht neutralisiert wurden, mußten erstere außer dem Letalfaktor noch einen weiteren Letalfaktor Z enthalten. B-Antiseren neutralisierten andererseits C-Filtrate, während B-Filtrate durch C-Antiseren nicht neutralisiert wurden. Dies begründete die Annahme, daß B-Filtrate außer den Letalfaktoren W und Z noch einen Letalfaktor X besitzen mußten.

D-Filtrate wurden durch die B- und D-Antiseren neutralisiert. Demzufolge mußte in den B- und D-Filtraten mindestens ein gemeinsamer Letalfaktor X enthalten sein. WILSDON stellte die mengenmäßige Letalfaktorenverteilung bildlich folgendermaßen dar:



GLENNY, BARR, LLEWELLYN-JONES, DALLING und ROSS (20) zeigten 1933, daß WILSDON'S Letalfaktor Z aus 3 toxischen Bestandteilen zusammengesetzt war. Sie schlugen für die Toxine eine griechische Alphabet-Terminologie vor. Es bildeten:

Typ A = α -Toxin = WILSDON'S W-Faktor

Typ B = α - und (β -, γ -, δ -) -Toxin = WILSDON'S
Z-Faktor

und ϵ -Toxin = WILSDON'S X-Faktor

Typ C = α - und (β -, γ -, δ -) -Toxin

Typ D = α - und ϵ -Toxin

Vorstehende Bezeichnung der Toxine hat sich allgemein durchgesetzt und die 3 Letalfaktoren WILSDON'S entsprechen den heute so bezeichneten α -, β - und ϵ -Toxinen.

PRIGGE (46) zeigte 1937, daß eine Haemolyse bei A-Filtraten durch 2 Fraktionen hervorgerufen wurde. Eine dieser Fraktionen ist das α -Toxin, die PRIGGE als β -Toxin bezeichnete, die andere ist das θ -Toxin, die PRIGGE α -Toxin nannte.

NAGLER (34) entdeckte 1939, daß der Typ A in einem Menschenserum enthaltenden Medium Opaleszenz hervorrief. Er konnte dieses Phänomen durch Anti- α -Serum ausschalten und dadurch beweisen, daß das α -Toxin für die Opaleszenz verantwortlich zu machen war. MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON (29) beobachteten 1941, daß durch α -Toxin bei Eigelblösung eine stärkere Opaleszenz als bei Menschenserum hervorgerufen wurde. Diese Fähigkeit des α -Toxins wurde einer Lezithinase zugesprochen, weil gezeigt werden konnte, daß das in dieser Lösung enthaltene Lezithin in Phosphocholin und Stearyloleilglycerid gespalten wurde (OAKLEY (36)).

Bei Untersuchungen über die Toxin-Antitoxin-Bindungsfähigkeit des α -Toxins ergab sich, daß die als Ovovitellintest bezeichnete Reaktion zum Nachweis des α -Toxins Ca- und Mg-Ionenabhängig ist (OAKLEY, WARRACK (35)).

In einer kritischen Arbeit über die Toxine gab OAKLEY (36) 1943 einen Überblick über den Stand der Cl. welchii-Forschung.

Im gleichen Jahr berichtete BOSWORTH (4) über die Isolierung eines neuen, dem Cl. welchii zugehörigen Types aus Kälbern, dessen Toxinfiltrat nur von dem homologen Serum neutralisiert wurde und über einen neuen Letalfaktor, den BOSWORTH ϵ -Toxin nannte. Der Stamm wurde als Typ E bezeichnet.

MACFARLANE und MAC LENNON (30) beschrieben 1945 die Zerstörung frischer Muskulatur bei Bebrütung in Cl. welchii A-Kulturen. Die Autoren vermuteten, daß eine in den A-Filtraten enthaltene Kollagenase die Zerstörungen hervorrief.

OAKLEY, WARRACK und VAN HEYNINGEN (37) konnten 1946 beweisen, daß neben dem α - und dem θ -Toxin ein zusätzliches, immunologisch erfaßbares Toxin vorhanden war, das sie κ -Toxin nannten.

OAKLEY, WARRACK und WARREN (38) beschrieben 1948 das Vorhandensein eines λ -Toxins in B-Filtraten. Dieses Toxin vermochte Hautpulver und mit großer Wahrscheinlichkeit auch Gelatine, aber nicht Kollagen anzugreifen, während das κ -Toxin alle 3 Substanzen zerstörte. Frische Normalseren enthielten einen λ -Toxin-Inhibitor, der von dem durch Immunisierung gebildeten λ -Toxin-Antikörper elektrophoretisch getrennt werden konnte.

Der von BURNET im Jahre 1948 entwickelte ACRA-Test zum Nachweis der Hyaluronidase in den Kulturfiltraten von Cl. welchii wurde 1951 von OAKLEY und WARRACK (41) verbessert, und von ihnen für die Bestimmung der Desoxyribonuclease angewendet. Der Test beruht darauf, daß ein Gemisch einer Gelenkflüssigkeit und einer wässrigen Kongorotlösung unter bestimmten Bedingungen ein kompaktes blaues Klümpchen bildet, sobald man einen Tropfen dieses Gemisches in angesäuerten Alkohol fallen läßt. Bei Hyaluronidaseanwesenheit wird dieser Tropfen verdaut.

1949 beschrieben ZEISSLER und RASSFELD-STERBERG (55) einen hitzeresistenten Stamm von Cl. welchii, der vorwiegend lange Stäbchen und auch überwiegend rauhe Kolonien bildete. Dieser Keim wurde bei Fällen von teilweise tödlich verlaufenden und mit entzündlich nekrotisierenden enteritischen Erscheinungen einhergehenden Lebensmittelvergiftungen in Deutschland isoliert. Der als Bac. enterotoxigenus bezeichnete Keim bildete nur das α -, β -, γ - und ν -Toxin. Wegen seiner Toxinarmut und seiner Hitzeresistenz wurde er von OAKLEY (39) als selbständige Erregerart angesehen und als Typ F bezeichnet.

OAKLEY und WARRACK (43) veröffentlichten 1953 eine Übersicht über das Vorkommen und die Verteilung der löslichen Antigene bei den 6 Typen des Cl. welchii. Ein Stamm wurde unter Vernachlässigung der μ - und ν -Toxine auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein aller Toxine geprüft, wobei die toxische und enzymatische Wirkung unter Einschaltung genügender Kontrollen durch monospezifische Seren aufgehoben oder nicht aufgehoben wurde.

BROOKS, STERNE und WARRACK (6) prüften 1957 über 300 Stämme von Cl. welchii, die sie aus verschiedenen Ländern bezogen hatten. Sie konnten bei den Typen A, B und C gut definierte Gruppen bestimmen, die sich von den "klassischen Modellen der Toxinbildung" unterschieden. Die Autoren sahen Typ F als eine Untergruppe des Types C an. Sie forderten eine sich strikt nach den Hauptletaltoxinen orientierende Typendifferenzierung bei Cl. welchii.

Die von ihnen ausgearbeitete Tabelle (siehe Tabelle 1) gibt einen Überblick über das Vorkommen der Typen und Subtypen sowie über die Eigenschaften und die Verteilung der löslichen Toxine bei Cl. welchii.

Tabelle 1: Übersicht über die Typen und Subtypen sowie über die Eigenschaften und Verteilung der Toxine bei *Cl. welchii* (nach BROOKS, STERNE und WARRACK, 1957)

Typ		Vorkommen	Hauptletalttoxine			
			α	β	ε	γ
			Letale, nekrotische, hämolytische (Ca abhängig, Lecithinase)	Letale, nekrotische	Letale, nekrotische (gebildet als Pro-toxin, das durch Trypsin aktiviert wird)	Letale, nekrotische (gebildet als Pro-toxin, das durch Trypsin aktiviert wird)
A	Klassisch	Gasbrand beim Menschen, Eingeweidekom-mensal b.Mensch u. Tier,in der Erde usw.	+++	-	-	-
	Lebens-mittel-vergifter	Lebensmittel-vergiftungen bei Menschen	+++	-	-	-
B	Klassisch	Lämmerdysenterie bei Fohlen	+++	+++	++-	-
	Iranisch	Haemorrhagische Enteritis bei Ziegen und Schafen im Iran	+++	+++	+++	-
C	Klassisch	"Struck b.Schafen"	+++	+++	-	-
	Colorado	Haemorrhagische Enteritis bei neugeborenen Käl-bern u.Lämmern	+++	+++	-	-
	Ferkel	Enteritis bei Ferkeln	+++	+++	-	-
D		Enterotoxaemie b. Schafen, Lämmern, Ziegen u.Rindern	+++	-	+++	-
E		Bei Schaf und Rind (pathogen?)	+++	-	-	+++
F		Enteritis necro-ticans b.Menschen	+++	++-	-	-

Letale Nebentoxine und nichtletale Toxine							
γ	δ	η	θ	κ	λ	μ	ν
Letale	Letale, haemolytische	Letale (zweifelhaft)	Haemolytische, letale (?) (sauerstoffempfind- lich)	Collagenase	Proteinase, Gelatinase (zersetzt pulveri- sierte Haut, aber nicht Collagen)	Hyaluronidase	Desoxyribonuclease
-	-	(+)	++	++	-	+	++
-	-	-	(+)	++	-	+	++
++	(+)	-	++	-	+++	+++	++
?	-	-	+++	+++	-	-	+
++	+++	-	+++	+++	-	-	+
?	-	-	+++	+++	-	-	+
?	-	-	+++	+++	-	(+)	++
-	-	-	++	++	++	+++	+++
-	-	-	++	++	++	(+)	+++
++	-	-	-	-	-	-	+++

+++ = von allen Stämmen gebildet
 ++ = von den meisten Stämmen gebildet
 +- und +- = von einigen Stämmen gebildet
 (+) = von sehr wenigen Stämmen gebildet
 +++ = in großen Mengen gebildet

TZIMAS (52) versuchte sich 1964 mit Hilfe von Mäuseletalitätstesten unter Verwendung der Pope-Bouillon als Nährmedium Klarheit über die toxische Wirkung der Cl. welchii-Stämme zu verschaffen. Bei seinen Untersuchungen erwiesen sich die B- und D-Filtrate sehr toxisch, während die E- und F-Filtrate weniger letal wirkten. Die A- und C-Filtrate wurden reaktionslos von den Mäusen vertragen und als atoxisch bezeichnet.

MATTHES (32) erhielt mit Hilfe des Hautnekrosetestes an Kaninchen ähnliche Ergebnisse wie TZIMAS. Beide Autoren verwendeten dieselben Standardstämme.

Eine Wirtsspezifität gibt es bei den Typen des Cl. welchii nicht (OAKLEY (40)).

MC GOWAN (21) beschrieb Typ A als Erreger einer tödlich verlaufenden Enterotoxaemie bei Sauglammern, OTTEN und HENZE (45) wiesen ihn als ursächlichen Keim einer Tonsillitis bei Hunden nach und ZELLER (57) isolierte ihn bei einem an Gasbrand erkrankten Bullen.

MC LENNAN (27) und KOHN (26) beschrieben Typ D als Erreger einer Enteritis beim Menschen; MOVINAGA (33) isolierte den gleichen Typ bei einem menschlichen Gasbrandfall, während MARSHALL (31) den Typ E als ursächlichen Keim eines haemorrhagischen Fiebers bei Menschen in Korea feststellte.

EGGERT (13) konnte mit Typ F experimentell eine tödlich verlaufende Enteritis necroticans bei einem Hunde hervorrufen.

Das α -Toxin besitzt bei A-Stämmen die größte Pathogenität. (COOKE (9), EVANS (14, 15, 16), ZWISLER und PRANTER (58)). Bei den Enterotoxaemien wird im allgemeinen das ϵ -Toxin im Tierkörper nachgewiesen (BULLEN, SCARISBRICK

(7), THAMSON, BATTY (50)) aber auch das β - oder ϵ -Toxin gefunden (ROBERTS (47)).

Ob bei anderen Clostridien die Vielfalt der Toxine ebenso groß ist wie bei Cl. welchii, läßt sich nicht klar beantworten. Es spricht aber vieles dafür, wenn die anderen Clostridienarten auch so gründlich wie das Cl. welchii untersucht werden würden. (VAN HEYNINGEN (24)).

Eigene Untersuchungen

Zweck der Versuche war festzustellen, ob mit Hautnekrosetesten an immunisierten Meerschweinchen eine Typendifferenzierung bereits typisierter Stämme durchführbar ist.

In Vorversuchen waren Fragen der optimalen Gewinnung der Toxine, der Erhaltung der Toxinaktivität bei Aufbewahrung und der Empfindlichkeit des Hautnekrose- und Mäuseletalitätstestes bei Injektionen von Toxinfiltraten zu untersuchen.

Durch Neutralisationsteste sollte dann weiterhin im Mäuseversuch an wöchentlich von immunisierten Meerschweinchen gewonnenen Seren der Zeitpunkt des höchsten Antikörpergehaltes bestimmt werden.

Durch vergleichende Testungen an immunisierten und nicht immunisierten Meerschweinchen war festzustellen, inwieweit der Hautnekrosetest Rückschlüsse auf den vorliegenden Welchii-Typ zuließ.

Schließlich sollte mit Hautnekrosetesten an sensibilisierten Meerschweinchen geprüft werden, ob die Reaktionen der lokalen Anaphylaxie (Arthusphänomen) bei Cl. welchii-Toxinfiltraten als spezifisch angesehen werden konnten.

A. Material und Methoden

1. Stämme und Kultivierung

Ich verwendete für die Untersuchungen 10 typisierte Stämme. Die Stämme Typ A CN 3920 (A_1), Typ B CN 684 (B_1), Typ C CN 3690 (C_1), Typ D CN 3683 (D_1) und Typ F CN 3754 (F) wurden im September 1967 als lyophilisierte Kulturen in Vakuumampullen von Burrrays Wellcome & Co aus London erhalten, während der Stamm Typ E CN 5063 (E) im Mai 1964 in lyophilisierter Form von Burrrays Wellcome & Co bezogen worden war.

Die Stämme Typ A 3624 (A_2), Typ B 3626 (B_2) und Typ C 3628 (C_2) befanden sich seit September 1967 im Institut und wurden als Lyophilisate von der amerikanischen Typ-Kultur-Sammlung aus Rockville (Maryland) bezogen. Der Stamm D 175 (D_2) war dem Institut in lyophilisiertem Zustande im März 1962 von Herrn Professor Dr. Mitscherlich, Göttingen, zugesandt worden.

Alle 10 Stämme wurden in Leber-Leber-Bouillon (LLB) in Reagenzröhrchen bei Kühlschranktemperaturen unter Parafinverschluß aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurden sie auf Traubenzucker-Blut-Agar-Platten (Pyrogallol - K_2 CO₃ -Verfahren mit Bierfilz (23)) subkultiviert und auf Reinheit und Wachstumsintensität geprüft.

Von einer Reinkultur wurde eine einzelne, mittelgroße Kolonie auf eine LLB Überimpft, um diese nach Bebrütung als Einsaatkultur für das von LOGAN (28) beschriebene Nährmedium in Röhrchen oder Erlenmeyerkölbchen zur Toxinproduktion zu verwenden. Die Nährmedien in den Röhrchen wurden unter Abschluß mittels einer ca. 1 cm hohen Parafinschicht aufbewahrt.

Vor der Beimpfung wurden alle Nährmedien in den Reagenz-

röhrchen 10 Min. und in den Erlenmeyerkölbchen 20 Min. bei 100° C erhitzt und anschließend mit Leitungswasser abgekühlt. Die Beimpfung der Reagenzröhrchen erfolgte mit 2 Ösen Einsaatkultur, bei Erlenmeyerkölbchen wurden 0,5 ml Einsaatkultur mit der Pipette überimpft. Die Bebrütung der Erlenmeyerkölbchen erfolgte im evakuierten Exsikkator.

Die Bebrütungszeit der Traubenzucker-Blut-Agar-Platten betrug stets 16 Stunden. Bei der als Einsaatkultur verwendeten LLB und dem zur Toxinproduktion benutzten LOGAN-Nährmedium wurde die Bebrütungszeit unterschiedlich auf 6 oder 16 Std. bemessen.

Die Bebrütungstemperatur betrug in jedem Fall 37° C.

2. Herstellung toxinhaltiger Filtrate

Für die Toxinproduktion wurde eine von LOGAN (28) 1945 beschriebene Caseinhydrolysat-Dextrin-Bouillon (CDB) verwendet, weil sich dieses Nährmedium in Vorversuchen besser als die Glukose-Pepton-Bouillon II (GPB II) nach HINZ (25) bewährt hatte.

Zur Herstellung der CDB mußten zunächst 2 Substrate angefertigt werden.

a. Mit Fettlösungsmittel extrahierte Rinderherzmuskulatur

Nach Zerkleinerung der vom Fett weitgehend befreiten Herzmuskulatur mittels Fleischwolf wurde 1 kg des Fleischbreies gründlich mit 3 l 95 %igem Alkohol vermischt und 4 Stunden bei wiederholtem Durchkneten stehen gelassen. Die Entfernung des alkoholischen Herzmuskelauszuges erfolgte durch einen Stoffbeutel und Auspressen des Rückstandes.

Die extrahierte Herzmuskelmasse wurde in ein Gefäß mit 3 l eines Alkohol-Äthergemisches (1:1) gegeben, unter wiederholtem Durchkneten weitere 4 Stunden extrahiert und nochmals durch einen Stoffbeutel von der Flüssigkeit getrennt.

Schließlich kam die Herzmuskelmasse auf Pergamentpapier in dünner Schicht, um eine Trocknung der Masse bei 20° C herbeizuführen.

Mit einer Kaffeemühle wurde die Trockenmasse zu kleinstmöglicher Teilchengröße gemahlen und dann in sterilen mit Zellstoffstopfen verschlossenen Erlenmeyerkolben bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

b. 25 %ige Dextrinsuspension

Diese wurde in der Weise hergestellt, daß 100 g trockenen Dextrinpulvers in 1 l Aqua dest. suspendiert und bei 4° C über Nacht stehen gelassen wurden. Nach Abgießen des klaren Überstandes wurde der ungelöste Rückstand zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Es folgten eine Resuspendierung von 25 g des getrockneten Dextrins in 100 ml Aqua dest. und eine Sterilisation im Autoklaven bei 0,75 atü 20 Min. lang.

c. Herstellung der CDB nach LOGAN

In ca. 500 ml Aqua dest. wurden gelöst: 16,0 g pankreatisch verdautes Caseinhydrolysat (Merck), 5,76 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,48 g KH_2PO_4 , je 0,02 g MgSO_4 , l-Cystin, l-Tryptophan und 5,0 g Natriumsuccinat. Die Lösung wurde auf pH 7,8 mit 10,7n NaOH eingestellt und ca. 50 ml Aqua dest., das je 1,0 g Ca-d-pantothenat, Pimelinsäure, Nicotinsäure, Pyridoxalhydrochlorid, Thiamindichlorid und 0,0001g Riboflavin in gelöstem Zustande enthielt, zugegeben. Auffüllung mit Aqua dest. auf 1000 ml und Korrektur mit 10,7n NaOH auf pH 7,2.

Die Lösung wurde in Reagenzröhrchen zu 12 ml und in

Erlenmeyerkölbchen zu 100 ml abgefüllt.

Es folgte eine Zugabe von 0,5 bzw. 2,5 g extrahierter Rinderherzmuskulatur in Reagenzröhrchen bzw. Erlenmeyerkölbchen und bei den Röhrchen ein Verschluss der Nährbodenoberfläche mit flüssig gemachtem Paraffin.

Nach 20minütigem Autoklavieren bei 0,75 atü sank der pH-Wert von 7,2 auf 7,0 ab.

Unmittelbar vor Beimpfung wurden jedem Röhrchen 0,5 ml und jedem Kölbchen 2,5 ml der 25 %igen sterilen Dextrinsuspension unter Vermeidung des Luftzutrittes zugesetzt (Pipettieren der Suspension an der Glaswand).

Die Kulturen in den Erlenmeyerkölbchen wurden nach Bebrütung zunächst 20 Min. bei 3000 U/min. zentrifugiert, um den Überstand dann durch Seitzfilter (E.K. Filter Gr. 3) zu filtrieren. Bei den Kulturen in den Röhrchen konnte auf ein Zentrifugieren vor der keimfreien Filtration verzichtet werden.

Die Kulturfiltrate der Stämme wurden in sterilen, mit Zellstoffstopfen verschlossenen Spitzröhrchen zu ca. 2,0 ml abgefüllt und bei -19° C gelagert.

Bei den Typen D und E unterlagen die Filtrate in zwei Versuchen einer Behandlung mit 5 g-% Trypsin. Dabei wurde die Trypsin-Suspension 1/2 Std. bei 37° C im Wasserbad erwärmt und anschließend 1/4 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

3. Vakzineherstellung zur Immunisierung und Sensibilisierung der Meerschweinchen

Die Filtrate wurden mit 0,4 Vol. % Formalin versetzt und 7 Tage im Brutschrank bei 37° C belassen. Wirkten nach dieser Zeit 0,4 ml, an 3 Mäuse verimpft, nicht mehr letal, so

wurde eine Prüfung auf Keimfreiheit durchgeführt.

Bei negativen Ergebnissen der Mäusetestung und der bakteriologischen Untersuchung wurden 50 ml des Filtrates nach CARPENTER (8) an 2,33 ml einer 10 %igen $AlCl_3$ -Lösung adsorbiert. Danach wurde auf pH 7,0 mit 20 %iger NaOH eingestellt und auf 100 ml mit steriler 0,85 %iger NaCl aufgefüllt. Die Vakzinen wurden bei +5° C aufbewahrt.

Die Immunisierung der Meerschweinchen geschah durch dreimalige subkutane Injektion von 5,0 ml Adsorbatvakzine im Abstand von 3 Tagen, die Sensibilisierung wurde durch eine einmalige subkutane Injektion von 10,0 ml Adsorbatvakzine vorgenommen. Da höchstens 2,5 ml an einer Impfstelle injiziert werden konnten, wurden die Injektionen auf mehrere Injektionsstellen verteilt.

4. Ermittlung der kleinsten letal wirkenden Dosis (Dlm) und der kleinsten nekrotisierenden Dosis (Dnm) im Letalitäts- und Hautnekrosetest

Für die Letalitätsteste wurden 18 - 20 g schwere NMRI-Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Die Zucht wurde im Jahre 1961 mit Mäusen der Versuchstierzucht Hannover-Linden begonnen und war frei von Ektromelie, Salmonellose und anderen Erkrankungen. Die Tiere wurden konventionell aufgezogen und gehalten. Bei über 2 Jahre alten weiblichen Mäusen traten etwa zu 10 % Mammatumore auf.

Zur Ermittlung der Dlm wurden die Toxinfiltrate i.v. in eine Schwanzvene mit einer 1 ml-Spritze und der Kanüle Cro-ni 0,25 x 19 mm injiziert. Als Dlm galt die geringste Menge, die innerhalb von 24 Stunden drei 18 - 20 g schwere Mäuse tötete.

Für die Hautnekroseteste wurden adulte, konventionell gezogene und gehaltene männliche und nichtträchtige weibliche Albinomeerschweinchen verwendet.

Einen Tag vor Ausführung des Testes wurden die Haare auf dem Rücken mit einer Schere kurz abgeschnitten, um sie dann nach Einseifen mit einer Rasierklinge zu rasieren. Nach Herstellung geometrischer Verdünnungsreihen mit den Filtraten und steriler 0,85 %iger NaCl wurden 0,1 ml mit einer 1 ml-Spritze und der Kanüle Cro-ni 0,25 x 19 mm intrakutan injiziert. An der Injektionsstelle bildete sich eine linsengroße Quaddel, die nach 1 Stunde meist wieder verschwunden war. Bei einem Tier wurden bis zu 15 Injektionen ausgeführt, wobei zwischen 2 benachbarten Injektionsstellen als geringster Abstand ca. 10 mm belassen wurden. Es galt diejenige Verdünnung als positiv, bei der sich nach 48 Stunden eine deutlich erkennbare Nekrose abzeichnete. Die Nekrose war an einer weißgrauen Verfärbung der Haut um die Injektionsstelle erkennbar. Auch ein stecknadelkopfgroßer Nekroseherd wurde als positiv gewertet.

5. Technik der Neutralisation im Letalitätstest

Zur Durchführung von Neutralitätstesten wurden die Seren von immunisierten Meerschweinchen verwendet. Die Gewinnung erfolgte durch Herzpunktion. Die Menge von ca. 4 ml Blut je Meerschweinchen wurde in Spitzröhrchen zunächst 2 Std. bei 20° C und dann 16 Std. bei 5° C aufbewahrt. Nach vollständiger Lösung des Blutkuchens mit einer sterilen Öse von der Glaswand wurde zentrifugiert. Das klar gewonnene Serum wurde bei -19° C aufbewahrt.

Die Neutralisationsteste vollzogen sich in folgender Weise:

1. Feststellung der Dlm an 3 Mäusen
2. Mischung des Serums mit dem homologen Filtrat bzw. Filtratverdünnung im Verhältnis 1 : 1
3. Aufbewahrung des Serum-Filtrat-Gemisches 1 Std. bei 20° C
4. Intravenöse Impfung von 2 Mäusen mit dieser Mischung zur Ermittlung der Dlm

Bei Überleben der Tiere wurde die Mischung mit dem benutzten Filtrat bzw. der benutzten Filtratverdünnung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und in abgestuften Mengen i.v. an zwei Mäuse verimpft, um die Dosis zu ermitteln, die durch das Antiserum nicht neutralisiert wurde. Die nächst höhere Stufe wurde dann als neutralisierende Dosis angesehen. Überlebten die Mäuse auch diesen Testversuch, so wurde die Mischung mit dem Filtrat bzw. der Filtratverdünnung abermals im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und wie beschrieben verfahren.

Zur Kontrolle wurden stichprobenweise Normalseren von Meerschweinchen mit Toxinfiltraten ebenfalls an 2 Mäuse i.v. verimpft. Die Mengen des Normalserums und der Toxinfiltrate richteten sich dabei nach der ermittelten neutralisierenden Dosis des Antiserums.

B. Ergebnisse

1. Vergleich zweier optimaler flüssiger Nährmedien hinsichtlich der Toxinproduktion

Die Toxinproduktion bei *Cl. welchii* hängt neben der Bebrütungsdauer weitgehend von der Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums ab und kann nach WILDFÜHR (53) durch Kultur- und Tierpassagen erhöht werden.

Eine Steigerung der Toxinproduktion bei *Cl. welchii* ist nach DOMBOS-KÁTÓ und ILLENYI (12) durch Zugabe von 0,1%igem Vitamin H zum Nährmedium möglich.

Jedoch kann bei Stämmen mit ursprünglich schlechtem Toxinbildungsvermögen die Toxinproduktion nicht oder nur gering erhöht werden (WILDFÜHR (53), TOBESCH (51)).

Für die Gewinnung von Toxinfiltraten des *Cl. welchii* verglich ich die von HINZ (25) als optimaler Nährboden beschriebene Glukose-Pepton-Bouillon II (GPB II) mit der von LOGAN (28) 1945 entwickelten CDB.

Mit der CDB wurden von 5 Typstämmen, die HINZ zur Gewinnung seiner Toxinfiltrate mit der GPB II verwendet hatte, Toxinfiltrate nach 16-stündiger Bebrütung hergestellt und mit den von HINZ ermittelten Werten in der Tabelle 2 verglichen. Die pH-Werte betrugen bei der GPB II 7,6 und bei der CDB 7,0.

Bei den Zahlen handelte es sich um die Dlm, die bei der GPB II an 5 und bei der CDB an 3 Mäusen ermittelt wurden.

Tabelle 2: Übersicht über die kleinsten Letaldosen, die nach 16-stündiger Bebrütung bei 37⁰ C mit der GPB II und der CDB erhalten wurden. (Angabe in ml)

Stamm	BPB II (pH 7,6)	CDB (pH 7,0)
A ₁	0,05	0,1
B ₁	0,001	0,006
C ₁	0,4	0,04
D ₁	0,2	0,02
E	0,05	0,02

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Dlm der Typen C₁, D₁ und E bei der CDB signifikant höher lagen als bei den Filtraten der GPB II. Umgekehrt zeigten die Filtrate der Typstämme A₁ und B₁ bei der GPB II kleinere und daher bessere Letalwerte als bei der CDB.

Im Hinblick darauf, daß die CDB ausreichende Toxinmengen erzielte und die von HINZ mit der GPB II angegebenen Werte erst nach 4-bis 5-tägigen Kulturpassagen erhalten wurden, wurde für alle weiteren Versuche die CDB verwendet.

Ein Nachteil dieses Substrates war die umständliche Herstellung.

2. Toxingehaltsbestimmungen nach 6- und 16-stündiger Bebrütung bei pH 6,0 und 7,0 unter Verwendung des LOGAN-Nährmediums

TZIMAS (52) stellte im Letalitäts- und MATTHES (32) im Hautnekrosetest bei Verwendung der LLB nach 16-stündiger Bebrütung optimale Toxinwirkungen bei Cl. welchii fest.

Dagegen ermittelten ORLANS (44) für das α -, β - und δ - Toxin, GALE (19) für das θ -Toxin und OAKLEY (42) für das λ -Toxin nach 5-stündiger Bebrütung maximale Werte.

Da auch ZEISSLER (56) nach 6 Stunden größte Toxizität der Kulturfiltrate feststellen konnte und BROOKS, STERNE und WARRACK (6) ebenfalls 6-Stunden-Kulturfiltrate für die Untersuchungen verwendeten, prüfte ich unter Benutzung der CDB 6- und 16-Stunden-Kulturfiltrate bei pH 6,0 und 7,0 auf Ausbildung der Letalttoxine im Mäusetest.

Die Zahlen in Tabelle 3 stellen die an 2 Mäusen ermittelten kleinsten Letaldosen in ml dar.

Tabelle 3: Dlm der Stämme nach 6- und 16-stündiger Bebrütung bei pH 6,0 und 7,0 (Angabe in ml)

Stämme	pH 6,0		pH 7,0	
	6 Std.	16 Std.	6 Std.	16 Std.
A ₁	0,07	0,2	0,04	0,1
A ₂	0,04	0,1	0,02	0,06
B ₁	0,001	0,005	0,0009	0,006
C ₁	0,04	0,04	0,03	0,04
D ₁	0,04	0,02	0,04	0,02
D ₁ trypt- siniert	0,0008	0,001	0,0007	0,0007
D ₂	0,005	0,002	0,005	0,004
D ₂ trypt- siniert	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
E	0,02	0,02	0,04	0,02
E trypt- siniert	0,01	0,02	0,01	0,02
F	keine Le- talität	keine Le- talität	keine Le- talität	keine Le- talität

Die Tabelle zeigt, daß nach 6 Stunden bei A-, B- und C-Stämmen die Toxinfiltrate größere Letalität besaßen als nach 16 Stunden, hingegen hatten die D-Stämme und bei pH 7,0 auch der E-Stamm nach 16 Std. größere Letaltoxinsmengen ausgebildet als nach 6 Stunden.

Nach Trypsinierung nahm die Letalität bei den 6-stündigen D-Filtraten um das 10- bis 50-fache zu, während bei dem 6-stündigen E-Filtrat nur eine 2- bis 4-fache Erhöhung der Dlm ermittelt werden konnte.

16-stündige E-Filtrate wurden im Gegensatz zu gleichaltrigen D-Filtraten in der Letalität nicht mehr gesteigert, was auch ROSS, WARREN und BARNIS (48) berichteten.

BOSWORTH, der Entdecker des Types E, konnte, da er ausschließlich mit 18-stündigen Kulturfiltraten arbeitete, nicht erkennen, daß das ϵ -Toxin bei jungen Kulturen als Protoxin vorhanden und bei 16-stündiger Bebrütung der Kulturen in die toxische Stufe umgewandelt war.

Da nach BATTY und GLENNY (2) die ϵ -Toxizität durch Trypsinierung bis auf das 60-fache steigt und auch nach SMITH (49) eine erhebliche Letalitätssteigerung bei D-Kulturfiltraten nach Trypsinierung erwartet werden kann, dürfte das unterschiedliche Aktivierungsvermögen des ϵ - und ϵ -Protoxins als ein typenspezifisches Kriterium der D- und E-Stämme anzusehen sein.

Von den Hauptletaltoxinen zeigte in der Tabelle 3 das α -Toxin des Types A die größte pH-Wert-Abhängigkeit.

3. Einfluß der Aufbewahrung der Filtratchargen bei -19° C und $+37^{\circ}$ C auf die Toxinwirksamkeit

Um die Lagerungsfähigkeit 16-stündiger Kulturfiltrate der Stämme bei -19° C festzustellen, wurden die kleinsten

Letaldosen vor und nach längerer Lagerung bei dieser Temperatur ermittelt (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluß einer Lagerung der Filtratchargen bei -19°C auf die Dlm (Angabe in ml)

Stämme	1. Dlm-Bestimmung	2. Dlm-Bestimmung	Zeit zwischen beiden Bestimmungen i. Tagen
A ₁	0,09	0,09	30
A ₂	0,06	0,06	30
B ₁	0,002	0,006	82
B ₂	0,0007	0,002	30
C ₁	0,05	0,15	67
C ₂	0,05	0,07	30
D ₁	0,02	0,009	30
D ₂	0,007	0,003	82
E	0,02	0,03	82

A-Filtrate zeigten innerhalb von 30 Tagen keine Abnahme der Letalität, während B- und C-Filtrate unterschiedlich an Letalität einbüßten. D-Filtrate nahmen nach 30 Tagen bzw. 82 Tagen in der Letalität zu, wobei das atoxische ϵ -Protoxin in das ϵ -Toxin umgewandelt wurde. Die Letalität des E-Filtrates blieb innerhalb von 30 Tagen unverändert.

Zur Ermittlung der Letalitätsänderung pro Zeiteinheit wurden bei Filtratchargen, die 4, 8, 12 und 24 Stunden bei einer Temperatur von $+37^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt worden waren, die kleinsten Letaldosen ermittelt (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Einfluß einer 4-, 8-, 12- und 24-stündigen Aufbewahrung von Filtratchargen bei 37° C auf die Dlm (Angabe in ml)

Zeit der Dlm-Bestimmung	Zur Herstellung d.Filtrate verw.Stämme				
	A ₂	B ₂	C ₁	D ₁	D ₁ trypsin.
sofort	0,03	0,001	0,08	0,05	0,0005
nach 4 Std.	0,05	0,003	0,1	0,04	0,0005
nach 8 Std.	0,05	0,005	0,1	0,04	0,0005
nach 12 Std.	0,05	0,008	0,1	0,04	0,0005
nach 24 Std.	0,05	0,04	0,11	0,04	0,0004

Die Filtrate verhielten sich in ihren letalen Wirkungen nicht einheitlich. Die A₂-Filtratchargen zeigten nur in den ersten 4 Stunden eine geringgradige Letalitätsabnahme. Bei den B₂-Filtratchargen konnte nach 4, 8, 12 und 24 Stunden und bei den C₁-Filtratchargen nach 4 und 24 Stunden eine Letalitätsminderung festgestellt werden. Bei den D₁-Filtratchargen wurde dagegen nach 4 und den trypsinisierten D₁-Filtratchargen nach 24 Stunden eine geringgradige Letalitätszunahme ermittelt.

4. Vergleich der Dlm und Dnm der Toxinfiltrate bei einzelnen Typstämmen

Die nach BROOKS, STERNE und WARRACK (6) als Hauptletaltoxine bezeichneten α -, β -, ξ - und ζ -Antigene wirken letal und dermonekrotisch. In der Tabelle 6 wurden die geringsten letalen Dosen mit den geringsten nekrotischen Dosen (Dnm) verglichen und die Anzahl der auf 1 Dlm entfallenden geringsten nekrotischen Dosen der Filtrate in der letzten vertikalen Spalte aufgeführt.

Tabelle 6: Ermittlung der Anzahl der auf eine Dlm entfallenden geringsten nekrotischen Dosen aus der Dlm und Dnm der Filtratchargen der Stämme

Stamm	Dlm ml	Nekrot. Endtiter	Nekrot. Endstufe in ml	Dnm ml	Anzahl der auf 1 Dlm entf.nekrot. Dosen
A ₁	0,09	1 : 2	0,5	0,05	1,8
A ₂	0,06	1 : 4	0,25	0,025	2,4
B ₁	0,003	1 : 64	0,02	0,002	1,5
B ₂	0,001	1 : 128	0,008	0,0008	1,3
C ₁	0,05	1 : 32	0,03	0,003	16,7
C ₂	0,08	1 : 16	0,06	0,006	13,4
D ₁	0,01	1 : 4	0,25	0,025	0,4
D ₂	0,003	1 : 32	0,03	0,003	1,0
E	0,03	1 : 16	0,06	0,006	5,0

Bei den Typstämmen A bis C wurde mit subletalen Filtratmengen ein Nekroseeffekt hervorgerufen. Bei den D-Stämmen, deren Hauptletaltoxin das ϵ -Toxin ist, war das nicht der Fall. Demnach dürfte das ϵ -Toxin unter den Hauptletaltoxinen die geringste nekrotisierende Wirkung besitzen, während dem β -Toxin durch die größere Anzahl der auf 1 Dlm entfallenden geringsten nekrotischen Dosen bei den C-Stämmen eine große Nekrosewirkung zu eigen sein dürfte. Bei dem E-Stamm betrug die Dnm das 5-fache der Dlm.

5. Antikörperbildung in wöchentlichen Intervallen bei immunisierten Meerschweinchen

Da nach AKATOV (1) der durch Cl. welchii-Filtrate hervorgerufene Nekroseeffekt an mit Cl. welchii-Vakzine

immunisierten Kaninchen um so geringer ist, je höher der Antikörpergehalt im Serum ist, wurden Antikörpergehaltsbestimmungen im Neutralisationstest durchgeführt, um den Zeitpunkt des größten Antikörpergehaltes zu ermitteln.

Den Meerschweinchen wurden 3 mal im Abstand von 3 Tagen 5,0 ml Adsorbatvakzine s.c. injiziert. In wöchentlichen Abständen, gerechnet vom Zeitpunkt der 1. Injektion an, wurden Bestimmungen auf neutralisierende Antikörper vorgenommen (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Anzahl der kleinsten Letaldosen eines homologen Stammfiltrates, die von 1 ml Serum eines dreimal im Abstand von 3 Tagen mit 5,0 ml Adsorbatvakzine immunisierten Meerschweinchens 1, 2, 3 und 4 Wochen nach der ersten Immunisierung neutralisiert wurden.

Zeit nach der ersten Injektion	Zur Neutralisation verw. Stämme			
	B ₂	C ₁	D ₂	E
1. Woche	750	40	880	50
2. Woche	1450	80	1650	100
3. Woche	1980	60	2500	125
4. Woche	1650	40	2500	88

Bei dem Stamm C₁ war die Spitze des neutralisierenden Antikörpergehaltes bereits nach 2 Wochen erreicht. Bei den Stämmen B₂, D₂ und E wurde der höchste Antikörpergehalt erst nach 3 Wochen festgestellt. Das wöchentliche Intervall bei den Untersuchungen läßt die Möglichkeit zu, daß der Zeitpunkt des höchsten Antikörpergehaltes bei den Stämmen B₂ und E zwischen der 2. und 3. sowie bei D₂ zwischen der 3. und 4. Woche gelegen hatte. Ob diese Annahme zutrifft, wurde nicht geprüft.

6. Nekrotisierende Endtiter bei immunisierten und nicht immunisierten Meerschweinchen

Hautnekroseteste zur Typendifferenzierung bei Cl. welchii an immunisierten oder sensibilisierten Meerschweinchen sind noch nicht beschrieben worden. Es war das Ziel vorliegender Untersuchungen, diese Tests auf ihre Brauchbarkeit für die Typendifferenzierung zu prüfen. Die Filtrate wurden unverdünnt und in den Verdünnungen 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 usw. in einer Menge von 0, 1 ml intrakutan an Meerschweinchen verimpft, um die größte, noch gerade eine Nekrose hervorrufende Verdünnungsstufe (nekrotisierender Endtiter = Dnm) zu ermitteln.

In der Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Hautnekroseteste an immunisierten und nicht immunisierten Meerschweinchen unter Angabe der Filtratverdünnung, die noch gerade eine deutlich erkennbare Nekrose hervorrief, dargestellt.

24 Stunden p.i. war meist eine entzündliche Reaktion des Hautgewebes vorhanden, denen 48 Stunden p.i. Erscheinungen eines Gewebszerfalles folgten.

Filtrate einer niedrigen Verdünnungsstufe riefen stärkere und ausgedehntere nekrotische Prozesse hervor als die stärker verdünnten Filtrate. Bei schwacher Verdünnung konnte es vorkommen, daß sich die Nekrosen zweier benachbarter Injektionsstellen soweit ausbreiteten, daß nicht mehr erkennbar war, zu welcher Injektionsstelle der nekrotische Prozeß gehörte. Es wurden deshalb bei sehr toxischen Filtraten die Verdünnungen immer so gewählt, daß die Gewebsreaktionen möglichst auf die Injektionsstelle beschränkt blieben.

In einigen Fällen kam es bei immunisierten Meerschweinchen mit Filtratverdünnungen, die bei den nicht immunisierten Kontrollmeerschweinchen keine Hautreaktionen mehr bewirkten,

zu ausgeprägten Nekrosen. Diese Erscheinung wurde als eine allergische Reaktion aufgefaßt.

Tabelle 8: **Nekrotisierende Endtiter der Typpiltrate**
 (= Filtratverdünnungsstufen, die noch eine deutlich erkennbare Nekrose hervorrufen)
 bei dreimal im Abstand von 3 Tagen mit 5,0 ml Adsorbatvakzine immunisierten Meerschweinchen 3 Wochen nach der ersten Immunisierung und bei nicht immunisierten Meerschweinchen.

Zur Herst. d. Filtrate verwendete Stämme	Kontroll- tier	Zur Immunisierung der Meerschweinchen verwendete Stämme				
		A ₂	B ₂	C ₁	D ₂	E
A ₁	1:2	1:4	1:2	1:2	1:2	1:2
A ₂	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
B ₁	1:64	1:64	1:4	1:64	1:64	1:64
B ₂	1:128	1:128	1:16	1:64	1:32	1:128
C ₁	1:32	1:32	1:32	1:8	1:32	1:32
C ₂	1:16	1:32	1:16	1:4	1:16	1:16
D ₁	1:4	1:8	1:4	1:4	1:2	1:4
D ₂	1:32	1:32	1:32	1:32	1:4	1:32
E	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:4

Zu einer deutlichen Titerreduktion kam es bei den Filtraten der Stämme B₁, B₂, C₁, C₂, D₁, D₂ und E an den mit Typ-homologen Filtratvakzinen immunisierten Meerschweinchen. Bei intrakutaner Injektion von heterologen Filtraten wurden in den meisten Fällen bei immunisierten Meerschweinchen gleichhohe Titer wie bei den nicht immunisierten Kontrollmeerschweinchen festgestellt. Bei Meerschweinchen, die mit

A₂-Adsorbatvakzine immunisiert wurden, zeigten die Verdünnungsstufen der A₁-, C₂- und D₁-Filtrate geringe Titererhöhungen gegenüber den Kontrollmeerschweinchen. Dabei kam es bei der 1 : 2 -Verdünnung des A₁- und 1 : 4 -Verdünnung des A₂-Filtrates 48 Stunden p.i. an den Injektionsstellen zu einer durch Schorfbildung gekennzeichneten und mit Gewebseinschmelzungen einhergehenden entzündlichen Reaktion.

In der Erwartung, daß bei den homologen Filtraten an immunisierten Meerschweinchen durch neutralisierende Antikörper Titerreduktionen vorkommen würden, wurden an diesen Tieren nur bis zu den Filtratverdünnungsstufen injiziert, die 1 - 3 Tage vorher bei nicht immunisierten Kontrollmeerschweinchen als nekrotisierende Grenzverdünnungen ermittelt worden waren. Nur in wenigen Fällen wurde bei den immunisierten Meerschweinchen auch die nächsthöhere Verdünnung des an den Kontrollmeerschweinchen ermittelten nekrotisierenden Endtiters injiziert. Deshalb wurde an immunisierten Meerschweinchen bei Erhöhungen des nekrotisierenden Endtiters um eine Stufe nicht weiter geprüft, ob höhere Filtratverdünnungen gleichfalls Nekrosen hervorriefen. In Fällen von Titererhöhungen gegenüber den nekrotisierenden Endstufen an den Kontrollmeerschweinchen wurde angenommen, daß es sich bei den nekrotischen Prozessen an den Injektionsstellen um eine allergische Reaktion im Sinne eines Arthus-Phänomens handeln könnte. Diese Annahme schien auch deshalb begründet zu sein, weil die gesamte an ein Meerschweinchen verabreichte A₂-Adsorbatvakzinemenge schätzungsweise nur 75 inaktivierte Mäuse-Letaldosen betrug, also nur in geringem Maße antigen wirken konnte.

Aus den Ergebnissen ist wohl abzuleiten, daß die Titerreduktion für die Typen B, C, D und E typspezifisch ist und eine Möglichkeit bietet, bei entsprechender Kontrolle mit nicht immunisierten Meerschweinchen diese Typen zu erkennen.

Ähnlich wie im Mäuseletaltest hat der Hautnekrosetest allerdings den Nachteil, daß Titerreduktionen auch bei heterologen Filtraten vorkommen können. So traten beim B₂-Filtrat an dem mit C₁-Adsorbatvakzine und an dem mit D₂-Adsorbatvakzine immunisierten Meerschweinchen Titerreduktionen auf. Die Erklärung hierfür liegt darin, daß im ersten Fall die β -Antitoxine und im zweiten Fall die ϵ -Antitoxine die Titerreduktion bedingt haben dürften.

Ein F-Stamm ist in die Untersuchungen nicht einbezogen worden. F-Stämme entsprechen nach BROOKS, STERNE und WARRACK (6) bei Anwendung der WILSDON'schen Typeneinteilung weitgehend den C-Stämmen und können nach ZEISSLER und RASSFELD-STERBERG (56) sowie DIECKMANN (11) durch Hitzeresistenzprüfungen der Sporen von den C-Stämmen abgetrennt werden. Während die Sporen der Typen A bis E selten ein 10-minütiges Kochen überstehen, bleiben die Sporen des Types F nach 1- bis 4-stündiger Erhitzung bei 100° C noch lebensfähig.

Wie BOYD (5) angibt, vermögen nur präzipitierende Antigene Arthus-Reaktionen hervorzurufen. Nach OAKLEY und FULTHORPE (42) sowie ORLANS und JONES (44) haben die α -, β - und ϵ -Toxine präzipitierende Eigenschaften. Von dem ϵ -Toxin ist eine solche Eigenschaft noch nicht bekannt.

Um der Verwendbarkeit des Arthus-Phänomens für die Typendifferenzierung weiter nachzugehen, wurden Meerschweinchen 1 mal mit einer großen Dosis Adsorbatimpfstoff subkutan injiziert und eine intrakutane Testung der Filtratverdünnungen der 9 Stämme A₁ - E 8 Tage später vorgenommen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 9 unter Angabe der Filtratverdünnungen, die gerade noch eine deutliche Hautnekrose verursachten, zusammengestellt.

Tabelle 9: Nekrotisierende Endtiter der Typpiltrate bei einmal mit 10,0 ml Adsorbatvakzine s.c. inokulierten Meerschweinchen 8 Tage nach der Vakzinierung und bei nicht behandelten Meerschweinchen.

Zur Herst. d. Filtrate verwendete Stämme	Kon- troll- tier	Zur Sensibilisierung der Meer- schweinchen verwendete Stämme				
		A ₂	B ₂	C ₁	D ₂	E
A ₁	1:2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4
A ₂	1:4	1:8	1:4	1:8	1:8	1:8
B ₁	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:64
B ₂	1:128	1:128	1:64	1:64	1:128	1:128
C ₁	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
C ₂	1:8	1:8	1:8	1:8	1:16	1:8
D ₁	1:4	1:16	1:16	1:8	1:8	1:8
D ₂	1:16	1:16	1:32	1:32	1:16	1:32
E	1:16	1:16	1:32	1:16	1:32	1:32

Die ermittelten Titer bei den sensibilisierten Meerschweinchen entsprachen oft denen der Kontrolltiere. Doch traten auch Titererhöhungen auf, die mit einem Arthus-Phänomen in Zusammenhang gebracht werden könnten. Andererseits wurden auch Titererniedrigungen festgestellt, die durch eine anlaufende Antikörperbildung erklärt werden könnten.

Der gewählte Zeitpunkt für die Durchführung der Hautnekroseteste war vielleicht zu früh, und es wären möglicherweise eindeutiger Ergebnisse erzielt worden, wenn die Testungen 2 bis 3 Wochen p.i. vorgenommen worden wären.

Die Ergebnisse in Tabelle 9 lassen vorerst nur die Aussage

zu, daß eine Prüfung von Filtratverdünnungen im Hauttest 8 Tage nach einer einmaligen Vakzinierung mit einer großen Menge Adsorbatvakzine für eine Typendifferenzierung ungeeignet ist.

B e s p r e c h u n g

Von den 12 Toxinen, die von den 6 Typstämmen des Cl. welchii gebildet werden, besitzen diejenigen für die Typendifferenzierung ein besonderes Interesse, die mit einfachen Methoden nachzuweisen sind. Außer dem α -Toxin, das als Lecithinase durch den Ovovitellintest festgestellt werden kann und vom Typ A in weitaus größter Menge gebildet wird, nehmen die Letalttoxine β , ϵ und ζ als Erkennungsmerkmal für die Typen A bis F nach BROOKS, STERNE und WARRACK eine Sonderstellung ein.

Da die 4 Letalttoxine von den Typen A bis F in unterschiedlichen Mengen gebildet werden, bietet die Ermittlung der Dlm an der weißen Maus die Möglichkeit, über quantitative Unterschiede eine Wahrscheinlichkeitsdiagnose für die einzelnen Typen zu stellen. Typspezifische Antiseren lassen durch Neutralisierung der letalen Wirkung die Differenzierung des einzelnen Types zu.

Es ist eine Eigentümlichkeit der 4 Letalttoxine, daß sie neben der letalen Wirkung auch eine dermonekrotische Eigenschaft besitzen. Über die Brauchbarkeit der Dermo-toxine für die Typendifferenzierung hat MATTHES am Institut Untersuchungen am Kaninchen durchgeführt. In Fortführung dieser Versuche sollte der Hautnekrosetest an Meerschweinchen, die mit Toxoidfiltratvakzinen immunisiert waren, daraufhin geprüft werden, ob er eine Aussage über den vorliegenden Cl. welchii-Typ zuläßt und demzufolge für eine Typendifferenzierung geeignet ist.

ROBERTS hält den Intrakutantest an Kaninchen und Meerschweinchen für empfindlicher als den Mäuseletalitätstest. Die eigenen Untersuchungen an Meerschweinchen schienen das zu bestätigen. Doch ist einschränkend festzustellen, daß sich die Toxine der einzelnen Typstämme in ihrer nekrotisierenden Eigenschaft unterschiedlich verhalten.

MATTHES hat eine Übersicht von OAKLEY und WARRACK über die nekrotisch wirkenden Toxine bei den 6 Cl. welchii-Typen wiedergegeben und gleichzeitig die für die einzelnen Toxine typischen Merkmale der Nekrose beschrieben. An 10 Typstämmen prüfte MATTHES mit Seitzfiltraten von 16-stündigen Leber-Leber-Bouillon-Kulturen die Brauchbarkeit des Intrakutantestes am Kaninchen. Er kam zu dem Ergebnis, daß die Toxine der Typen B und D die stärksten nekrotisierenden Prozesse an der Haut hervorriefen und beide Typen durch den Hauttest bei Anwendung der Trypsinbehandlung zu unterscheiden waren. Die Typen E und F erzeugten nur schwach ausgeprägte Hautveränderungen, während die Filtrate der Typen A und C keinen nekrotischen Effekt bewirkten.

Die Abhängigkeit der Toxinbildung von der Zusammensetzung des Nährsubstrates und der Dauer der Bebrütung gab Anlaß, über die Untersuchungen von HINZ hinaus weitere Nährsubstrate auf ihre Eignung für die Toxinbildung der Cl. welchii-Stämme zu prüfen.

Dabei zeigte sich, daß das von LOGAN entwickelte Nährsubstrat günstige Eigenschaften besaß, jedoch war seine Herstellung umständlich.

Um das LOGAN-Substrat in seiner toxinbildenden Eigenschaft für das Cl. welchii mit der von HINZ beschriebenen und als optimal befundenen Glukose-Pepton-Bouillon II (GPB II) zu vergleichen, wurden unter Verwendung des LOGAN-Substrates 16-stündige Kulturfiltrate von den Stämmen, mit denen auch HINZ gearbeitet hatte, hergestellt und die ermittelten kleinsten Letaldosen den von HINZ unter Verwendung der GPB II erhaltenen minimalen Letaldosen gegenübergestellt. Der Vergleich zeigte, daß das LOGAN-Substrat bei den Stämmen A₁ und B₁ geringere Toxinmengen aufwies als die GPB II, während bei den Stämmen C₁, D₁ und E die Toxinfiltrate des LOGAN-Substrates toxischer als die der GPB II wirkten.

Da HINZ seine Stämme durch 4- bis 5-tägige Kulturpassagen in 8- und 16-stündigem Wechsel aktivierte, ich dagegen auf eine derartige Aktivierung verzichtete, ist die Annahme berechtigt, daß das LOGAN-Substrat auch für die Toxinbildung der Stämme A₁ und E₁ günstig war. Außerdem hatte HINZ sein Nährsubstrat auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt, während ich das LOGAN-Nährsubstrat mit einem pH-Wert von 7,0 benutzte.

Die Frage der Bebrütungsdauer beim LOGAN-Substrat wurde mit dem Ergebnis untersucht, daß die Letaltoxinausbeute bei den Cl. welchii-Typ-Stämmen, die keine Protoxine ausbildeten (A, B und C), beim LOGAN-Substrat nach 6-stündiger Bebrütung größer als nach 16-stündiger war. Bei den Protoxine ausbildenden D-Stämmen und dem E-Stamm wurde dagegen nach 16-stündiger Bebrütung eine größere Letalität als nach 6-stündiger Bebrütung ermittelt.

TZIMAS fand unter Verwendung der Leber-Leber-Bouillon, daß alle von ihm geprüften Stämme nach 16-stündiger Bebrütung größere Toxinmengen ausbildeten als nach 6-stündiger Bebrütung.

In einer Versuchsreihe mit unterschiedlichen pH-Werten von 6,0 und 7,0 des LOGAN-Substrates zeigte sich, daß letzterer pH-Wert die Gewähr für eine optimale Letaltoxingewinnung bot. Es wurde nicht geprüft, ob bei höheren pH-Werten eine bessere Toxinausbildung induziert wurde. Bei den 5 geprüften Cl. welchii-Typen war der Unterschied in der Toxinausbildung bei dem pH-Wert von 7,0 gegenüber dem pH-Wert von 6,0 bei Typ A am größten.

Für die eigenen Untersuchungen wurden bei -19° C gelagerte Filtratchargen verwendet. Dazu mußte klargestellt werden, ob der Toxingehalt sich während der Filtrataufbewahrung bei -19° C änderte oder nicht. Diese Versuchsreihe wurde mit dem Ergebnis abgeschlossen, daß sich bei A- und E-

Filtraten die Dlm nach bis zu 30-tägiger Aufbewahrung bei -19° C nicht änderte. Bei B- und C-Filtraten kam es in unterschiedlicher Zeit zu Letalitätsabnahmen und bei D-Filtraten zu Letalitätszunahmen.

Erheblich empfindlicher waren die Toxine gegenüber einer 4-, 8-, 12- und 24-stündigen Aufbewahrung bei 37° C. Die Toxizität des A-Filtrates sank schon nach 4 Stunden gering ab und blieb dann bei weiterer Aufbewahrung unverändert. Beim B-Filtrat verringerte sich die letale Wirkung nach 4, 8, 12 und 24 Stunden, während die Letalität des C-Filtrates nach 4 und 24 Stunden abgesunken war. Die Unbeständigkeit des in dem B-Filtrat enthaltenen stark letalen β -Toxins wird nach OAKLEY auf die Hyaluronidase zurückgeführt, die das β -Toxin zerstört. Da C-Filtrate die Hyaluronidase nicht besitzen, zeigen sie im allgemeinen größere Beständigkeit als B-Filtrate. Bei dem nicht trypsinisierten D-Filtrat kam es nach 4 Stunden zu einer geringen Letalitätszunahme, ebenso bei dem trypsinisierten D-Filtrat nach 24 Stunden.

Da sich das E-Filtrat nach 82-tägiger Aufbewahrung bei -19° C in seiner Letalität nur sehr geringgradig veränderte, wurde angenommen, daß das bei diesem Typ in der Hauptsache wirksame ϵ -Toxin relativ beständig ist.

Um eine Aussage über die Brauchbarkeit des Hautnekrosetestes für eine Typendifferenzierung zu ermöglichen, wurden die von den Typstämmen gebildeten Toxinmengen im Letalitätstest an der Maus und im Intrakutantest am Meerschweinchen verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß der Intrakutantest empfindlicher ist. Dies war insbesondere daraus zu ersehen, daß mit subletalen Mäusedosen der Typstämme A, B, C und E positive Intrakutanteste erhalten werden konnten. Bei den D-Stämmen war das nicht möglich, wie aus der Anzahl der auf eine Letaldose entfallenden geringsten nekrotisierenden Dosen zu er-

sehen war. Möglicherweise ist das beim Typ D überwiegende ϵ -Toxin in seiner nekrotisierenden Wirkung schwächer als die der α -, β - und γ -Toxine.

Wie stark die Meerschweinchen auf die Injektion der Adsorbatimpfstoffe der verschiedenen Typen mit Antikörperbildung reagierten, wurde in wöchentlichen Intervallen mittels Neutralisation im Letalitätstest an der weißen Maus geprüft. Die Versuche ergaben, daß der Gipfelpunkt der Antikörperbildung im Serum bei den Typen B, D und E 3 Wochen nach der ersten Injektion und beim Typ C nach 2 Wochen erreicht war.

Hautteste an immunisierten Meerschweinchen wurden stets 3 Wochen nach der ersten Impfung vorgenommen und führten zu dem Ergebnis, daß bei homologen Filtraten der Typen B, C, D und E eine Reduktion der Titer durch Neutralisation bewirkt wurde. Reagierte beispielsweise ein nicht immunisiertes Meerschweinchen bei einem B-Filtrat in der Titerstufe von 1 : 64 positiv, so reagierte ein mit gleichem Filtrat immunisiertes Meerschweinchen erst bei der Verdünnung 1 : 4 positiv. In einem solchen Fall wurde von Titerreduktion gesprochen. Bei einem schwach wirksamen D-Filtrat kam es aber auch vor, daß die Titerreduktion nur eine Verdünnungsstufe betrug. In einem derartigen Fall ist die Frage berechtigt, ob eine Verringerung um eine Titerstufe für einen bestimmten Typ schon eine Aussage zuläßt. Durch Wiederholung des gleichen Versuches unter Verwendung einer größeren Zahl von Meerschweinchen sollte in solchem Falle jeglicher Zweifel, daß es sich um ein Zufallsergebnis handelt, beseitigt werden. Bei den übrigen Stämmen von B₁ bis E war es jedenfalls möglich, an einer erheblichen Titerreduktion zu erkennen, welcher Typ vorlag.

Schwierigkeiten in der Differenzierung waren lediglich bei dem Typ A vorhanden. Mit A₂-Adsorbatvakzine immuni-

sierte Meerschweinchen reagierten merkwürdigerweise auf Injektion von A₁-, C₂- und D₁-Filtraten mit Titererhöhungen. Die Tatsache, daß das A₁-Filtrat in der Verdünnungsstufe 1 : 2 und das A₂-Filtrat in der Verdünnungsstufe 1 : 4 eine durch Schorfbildung gekennzeichnete und mit Gewebseinschmelzungen einhergehende entzündliche Reaktion, die sich von der sonst beobachteten Hautnekrose unterschied, hervorriefen, schien die Annahme zu stützen, daß es sich um eine allergische Reaktion (Arthus-Phänomen) handeln könnte.

Soweit Titerreduktionen bei heterologen Filtraten vorkamen, konnten sie auf Antikörper, die durch gemeinsam bei den Typen vorhandene Toxine gebildet waren, zurückgeführt werden. Solche Titerreduktionen waren in der Regel erheblich geringer als die Reduktionen, die durch Antikörper homologer Stämme bedingt waren.

Eine Typendifferenzierung an immunisierten Meerschweinchen kann bei dem Typ A auf Schwierigkeiten stoßen, weil die A-Stämme oft schlechte Toxinbildner sind. Wegen des großen Arbeits- und Zeitaufwandes ist jedoch dieses Verfahren auch für die Differenzierung der Typen B bis E nur beschränkt anwendbar.

Daher bleibt die von WILSDON durchgeführte Neutralisation im Mäuseletalitätstest mit typspezifischen Seren für die Routinediagnostik die Methode der Wahl. Eine wissenschaftlich fundierte Typenbestimmung gründet sich jedoch nach OAKLEY auf die Ermittlung des Vorhandenseins oder des Fehlens von 10 der 12 bekannten Toxine. Dabei kommt nach BROOKS, STERNE und WARRACK dem Nachweis des α -, β -, ϵ - und ζ -Toxins die größte Bedeutung zu.

Einmalige Vakzinationen von Meerschweinchen mit einer großen Impfstoffmenge führten 8 Tage p.v. zu keinen ein-

heitlichen Ergebnissen. Bemerkenswert ist, daß die Titer der vakzinierten Meerschweinchen, abgesehen von geringen Schwankungen, den Titern der Kontrolltiere nahezu entsprachen. Für geringe Titererhöhungen oder -erniedrigungen ließen sich keine Erklärungen finden. Es wird für möglich gehalten, daß die Sensibilisierung der Tiere auf die einmalige Vakzinierung hin noch nicht so weit vorangeschritten war, daß differenziertere Ergebnisse erzielt wurden.

Zusammenfassung

1. Im Mäuseletalitätstest wirksame Toxine der Typstämme A, B, C, D und E des Cl. welche ließen sich mit der von LOGAN entwickelten Caseinhydrolysat-Dextrin-Bouillon optimal gewinnen. Ein Nachteil des Nährmediums war die umständliche Herstellung.
2. Für die Gewinnung von letalwirkenden Toxinfiltraten mit dem LOGAN-Substrat war die Bebrütungszeit von 6 Stunden bei den Typen A, B und C des Cl. welche optimal. Bei dem Typ D war eine 16-stündige Bebrütung überlegen, weil die längere Bebrütungszeit die Umwandlung des ϵ -Protoxins in das ϵ -Toxin begünstigte. Bei dem Typ E war gleichfalls eine 16-stündige Bebrütungsdauer vorzuziehen.
3. Für die Toxinproduktion der Typen A, B, C, D und E war ein pH-Wert von 7,0 günstiger als ein pH-Wert von 6,0. Der größte Unterschied in der Toxinausbildung konnte beim Typ A festgestellt werden.
4. Eine Aufbewahrung 16-stündiger Kulturfiltrate bei -19° C minderte bei den Typstämmen B, C und E des Cl. welche die letale Wirkung der Toxine, vermehrte diese jedoch beim Typ D. Ein gleichsinniges Verhalten zeigten die Toxine der Typen B, C und D bei kurzfristiger Aufbewahrung der 6-stündigen Kulturfiltrate bei 37° C. Während 16-stündige A-Filtrate nach 30-tägiger Lagerung bei -19° C keine Letalitätsabnahme zeigten, konnte bei 6-stündigen A-Filtraten, die bei 37° C 24 Stunden aufbewahrt wurden, eine geringe Abnahme der Letalität festgestellt werden.
5. Der Hautnekrosetest am Meerschweinchen war im Vergleich zum Mäuseletalitätstest bei den Typen A, B, C und E empfindlicher. Für die Toxine des Types D sind Haut-

und Letalitätstest etwa gleich empfindlich.

6. Bei Meerschweinchen war der Antikörpergehalt des Serums 3 Wochen nach der ersten Impfung bei dreimaliger Verabreichung einer Adsorbatvakzine der Typen B, D und E am höchsten. Bei dem mit C-Adsorbatvakzine in gleicher Weise immunisierten Meerschweinchen konnte die Spitze schon nach 2 Wochen ermittelt werden.
7. Bei Meerschweinchen, die mit Typ B-, C-, D- und E- Adsorbatimpfstoffen immunisiert worden waren, ergaben Intrakutanteste mit homologen Toxinfiltraten signifikante Titerreduktionen gegenüber nicht immunisierten Meerschweinchen. Diese Reduktionen ließen Rückschlüsse auf den Typ zu. Doch ist die Anwendbarkeit des Intrakutantestes an immunisierten Meerschweinchen als Typendifferenzierungsmethode durch Umständlichkeit und Zeitaufwand in Frage gestellt. Bei dem Typ A kam es nach intrakutaner Injektion homologer Filtrate bei immunisierten Meerschweinchen nicht zu einer Titerreduktion.
8. Eine Sensibilisierung durch eine einmalige Applikation einer großen Impfdosis ließ sich mit Toxinfiltraten der Typen A bis E im Hauttest an Meerschweinchen 8 Tage p.v. nicht einwandfrei nachweisen.

Literaturverzeichnis

1. Akatov, A. K. The course of immunological reactions in the early period after revaccination with the antigen of *Cl. welchii* (Russ.) *Z. mikrobiol.* 12, 122 (1962)
Ref. in: *Excerpta medica* IV, 16, 1307 (1963)
2. Batty, J. u.
Glenny, A. T. The antigenic efficiency of *Cl. welchii* typ D ϵ -toxin and toxoid after treatment with trypsin
Brit. J. Exper. Path. 29, 141 (1948)
3. Bennetts, H. W. The relationship of *Bac. ovitoxicus* to *Bac. welchii*, to the lamb dysentery bacillus and to *Bac. paludis*.
Bull. Austr. Counc. Sci. Ind. Res. 57, 28 (1932)
4. Bosworth, T. J. On a new type of toxin produced by *Cl. welchii*
J. Comp. Path. 53, 245 (1943)
5. Boyd, W. C. Fundamentals of immunology 3.ed.
Interscience Publ. New York (1956)
S. 406
6. Brooks, M. E.,
Sterne, M. u.
Warrack, G.H. A re-assesment of the criteria used for type differentiation of *Cl. perfringens*
J. Path. Bact. 74, 185 (1957)
7. Bullen, J. J. u.
Scarisbrick, R. Enterotoxaemia of sheep: experimental reproduction of the disease
J. Path. Bact. 73, 495 (1957)
8. Carpenter, P. L. Immunology and serology
Saunders, Philadelphia & London (1956) S. 302
9. Cooke, W. T. Effects of *Cl. welchii*: Type A toxin on body tissues and fluids
Lancet 248, 457 (1945)
10. Dalling, T.,
Allen, H. R. u.
Mason, J. H. Research into certain animal diseases
Vet. Rec. N. S. 5, 561 (1925)

11. Dieckmann, C. Recovery of *Cl. welchii* type F
from preserved cultures
Brit. Med. J. (1949 I) S. 270

12. Dombos-Kátó, L. u.
Illényi, A. Die Steigerung der Toxinerzeugung
bei *Bac. parfringens*
Zschr. Immunit.forsch. 103, 216
(1943)

13. Eggert, E. Über eine oral mit *Bac. entero-*
toxicus erzeugte Darmerkrankung
beim Hund
Zbl. Bakt. I. Orig. 156, 210 (1950)

14. Evans, D. G. The protective properties of the
 α -antitoxin and θ -antihaemolysin
occurring in *Cl. welchii* type A
antiserum
Brit. J. Exper. Path. 24, 81 (1943)

15. Evans, D. G. The in-vitro production of α -toxin,
 θ -haemolysin and hyaluronidase by
strains of *Cl. welchii* type A, and
the relationship of in-vitro pro-
perties to virulence in guinea
pigs
J. Path. Bact. 57, 75 (1945)

16. Evans, D. G. Anticollagenase in immunity to *Cl.*
welchii type A infection
Brit. J. Exper. Path. 28, 24 (1947)

17. Mc Ewen, A. D. *Bac. paludis*: a new species of
pathogenic anaerobic bacterium
J. Comp. Path. 43, 1 (1930)

18. Mc Ewen, A. D. u.
Roberts, R. S. Struck: enteritis and peritonitis
of sheep caused by a bacterial
toxin derived from the alimentary
canal
J. Comp. Path. 44, 26 (1931)

19. Gale, E. u.
Heyningen, W. E. van The effect of the pH and presence
of glucose during growth on the
production of α - and θ -toxins
and hyaluronidase by *Cl. welchii*
Biochem. J. 36, 624 (1942)

20. Glenny, A. T.,
Barr, M.,
Llewellyn-Jones, M.,
Dalling, T. u.
Ross, H. E. Multiple toxins produced by some
organisms of the *Cl. welchii*
group
J. Path. Bact. 37, 53 (1933)

21. Mc Gowan, B.,
Moulton, J. E. u.
Rood, S. E. Lamb lösses associated with *Cl. perfringens* type A
J. Amer. Vet. Med. Ass. 133, 219
(1958)
22. Gubarjew, E. M. Bakteriochemie
Fischer, Jena (1958) S. 179
23. Hartwigk, H. u.
Tzimas, P. Die Züchtung von Anaerobiern auf
Traubenzuckerblutagar mit "Anoxy-
dator"-Scheiben
Dtsch. tierärztl. Wschr. 70, 537
(1963)
24. Heyningen, W. E. van Bacterial Toxins
Blackwell Oxford (1950) S. 23
25. Hinz, K.-H. Studien über das Alpha-Toxin von
Clostridium welchii
Vet.-med. Diss. Berlin FU (1964)
26. Kohn, J. u.
Warrack, G. H. Recovery of *Cl. welchii* type D
from man
Lancet (1955 I) S. 385
27. Mc Lennan, J. D. The role of clostridia in diarrheal
diseases of man
Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 162 (1956)
Ref. in: Excerpta medica IV, 10, 336
(1957)
28. Logan, M. A. u. a. Production of *Cl. welchii* α -toxin
J. Immunol. 51, 317 (1945)
29. Macfarlane, R. G.,
Oakley, C. L. u.
Anderson, C. G. Haemolysis and the production of
opalescence in serum and lecitho-
vitellin by the α -toxin of *Cl. welchii*
J. Path. Bact. 52, 99 (1941)
30. Macfarlane, R. G. u.
Mac Lennan, J. D. The toxæmia of gas-gangrene
Lancet (1945 II) S. 328
31. Marshall, J. D. u.
Anslow, R. O. *Cl. perfringens* iota antitoxin
levels in convalescent sera from
haemorrhagic fever patients
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N.Y.)
90, 265 (1955)
32. Matthes, S. Untersuchungen über die Dermotoxine
der 6 *Clostridium-Welchii*-Typen
am Kaninchen
Zbl. Bakt. I. Orig. 196, 508 (1965)

33. Movinaga, G.,
Nakamura, T.,
Yoshizawa, J. u.
Nishida, S. Isolation of *Clostridium perfringens* type D from a case of gas gangrene
J. Bact. 90, 826 (1965)
34. Nagler, F. P. O. Observation on a reaction between the lethal toxins of *Cl. welchii* (type A) and human serum
Brit. J. Exper. Path. 20, 473 (1939)
35. Oakley, C. L. u.
Warrack, G. H. Factors affecting the activity of the α -toxin of *Cl. welchii*
J. Path. Bact. 53, 355 (1941)
36. Oakley, C. L. The toxins of *Clostridium welchii*
Bull. Hyg. 18, 781 (1943)
37. Oakley, C. L.,
Warrack, G. H. u.
Heyningen, W. E. van The collagenase (K-toxin) of *Cl. welchii* type A
J. Path. bact. 58, 229 (1946)
38. Oakley, C. L.,
Warrack, G. H. u.
Warren, M. H. The Kappa and Lambda antigens of *Clostridium welchii*
J. Path. Bact. 60, 495 (1948)
39. Oakley, C. L. The toxins of *Cl. welchii* typ F
Brit. Med. J. (1949 I) S. 269
40. Oakley, C. L.,
Ross, H. E.,
Wright, G. P. u.
Macfarlane, M. G. Discussion on clostridial toxins in relation to typespecificity for different species of host
Proc. Roy. Sec. Med. 43, 883 (1950)
41. Oakley, C. L. u.
Warrack, G. H. The ACRA-test as a means of estimating hyaluronidase, desoxyribonuclease and the antibodies
J. Path. Bact. 63, 45 (1951)
42. Oakley, C. L. u.
Fulthorpe, A. J. Antigenic analysis by diffusion
J. Path. Bact. 65, 49 (1953)
43. Oakley, C. L. u.
Warrack, G. H. Routine typing of *Cl. welchii*
J. Hyg. 51, 102 (1953)
44. Orlans, E. S. u.
Jones, V. E. Studies on some soluble antigens of *Cl. welchii* types B, C and D
Immunology 1, 268 (1958)
45. Otten, E. u.
Henze, S. Bakteriologische Untersuchungen an der Tonsilla palatina des Hundes
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 66, 186 (1953)
46. Prigge, R, Experimentelle Untersuchungen über die serologischen Eigenschaften des Fraenkelschen Gasbazillus (*B. perfringens*)
Zschr. Immunit.forsch. 89, 477 (1937)

47. Roberts, R. S. In: Stableforth, A. W. und Galloway, I. A.: infectious diseases of animals due to bacteria
Butterworth London (1959) Bd. 1, S. 176
48. Rose, H. E.,
Warren, M. E. u.
Barnes, J. M. Cl. welchii ϵ -toxin, its activation by trypsin
J. Gen. Microbiol. 2, 148 (1949)
49. Smith, L. D. u.
Matsuoka, T. A comparison of Cl. perfringens ϵ -toxin-toxoid and protoxin-toxoid in the immunisation of young lambs
Amer. J. Vet. Res. 15, 361 (1954)
50. Thomson, A. u.
Batty, I. The antigenic efficiency of pulpy kidney disease vaccines
Vet. Rec. 65, 659 (1953)
51. Tobesch, K. Über das Vorkommen von Cl. welchii im Kot und Darm klinisch gesunder Schafe
Vet.-med. Diss. Berlin FU (1966)
52. Tzimas, P. Letalitäts-Prüfungen im Mausestest mit den 6 Typen des Cl. welchii unter Verwendung verschiedener flüssiger Nährmedien
Vet.-med. Diss. Berlin FU (1964)
53. Wildführ, G. Zur Frage der Toxinsteigerung durch Kultur- und Tierpassagen bei Stämmen aus der Gruppe der Gasoedemerreger
Zschr. Hyg. 130, 521 (1949/50)
54. Wilsdon, A. J. Observation on the classification of Bac. welchii
Rep. Inst. Anim. Path. Univ. Cambridge 2, 53 (1931)
55. Zeissler, J. u.
Rassfeld-Sternberg, L. Enteritis necroticans due to Cl. welchii type F
Brit. Med. J. (1949 I) S. 267
56. Zeissler, J.,
Krauspe, C. u.
Rassfeld-Sternberg, L. Die Gasoedeme des Menschen Steinkopff, Darmstadt (1958)
Bd. 2, S. 138
57. Zeller, M. u.
Thier, L. Gasbrand bei einem Bullen (Clostr. perfringens-Infektion)
Berl. Münch. tierärztl. Wochr. 78, 243 (1965)

58. Zwisler, O. u.
Franter, W.

Differenzierte Bestimmung von α -
und θ -Toxin aus *Cl. perfringens*
unter Verwendung spezifischer
Antisera
Behringwerk-Mitt. 46, 79 (1966)

Herrn Prof. Dr. H. Hartwig möchte ich für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung der Arbeit herzlich danken.

Allen Angestellten des Institutes, besonders Herrn Dr. H. Burow, sei für erwiesene Hilfe gleichfalls herzlich gedankt.

L e b e n s l a u f

Am 15. Oktober 1939 wurde ich als Sohn des technischen Angestellten Hans Franke und seiner Ehefrau Alice, geb. Neumann, in Klietz, Kreis Jerichow II, geboren.

Im August 1942 übersiedelten wir aus beruflichen Gründen meines Vaters nach Scheuno bei Forst (Niederlausitz).

Nach Kriegsende wurden wir dort ausgewiesen und zogen nach Berlin-Spandau.

Von 1946 - 1952 besuchte ich die Grundschule und von 1952 - 1960 die Oberschule in Berlin-Spandau und bestand an der Carl-Friedrich-v.-Siemens-Schule am 7. März 1960 meine Reifeprüfung.

Danach studierte ich 2 Semester Germanistik an der Freien Universität Berlin. Vom März 1961 bis zum Juli 1965 studierte ich an derselben Universität Tiermedizin. Meine tierärztliche Vorprüfung bestand ich am 23. April 1963, mein tierärztliches Staatsexamen legte ich am 5. Mai 1966 ab.

Die halbjährige Praktikantenzeit absolvierte ich vom 1. Juni bis zum 30. November 1966 bei Herrn Dr. Villwock in Altenwalde N.E., im Kreis Land Hadeln.

Seit dem 12. 12. 1966 bin ich als Doktorand an dem Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin tätig und bin seit dem 1. 8. 1967 an diesem Institut im Rahmen eines Forschungsauftrages beschäftigt.

